

**Cpds. for radiation therapy or diagnostics contg. Mossbauer nuclides -  
esp. ruthenium or iron in isotopically enriched form in metallocene or  
half-sandwich-carbonyl complexes**

**Publication number:** DE4014762 (A1)

**Publication date:** 1991-11-07

**Inventor(s):** WENZEL MARTIN PROF DR [DE] +

**Applicant(s):** WENZEL MARTIN PROF DR [DE] +

**Classification:**

- **international:** **A61K51/04; C07F15/00; C07F17/02; A61K51/02; C07F15/00; C07F17/00;** (IPC1-7): A61K49/02; C07D471/04; C07F15/00; C07F17/00

- **European:** A61K51/04L2G; C07F15/00N4; C07F17/02

**Application number:** DE19904014762 19900505

**Priority number(s):** DE19904014762 19900505

**Abstract of DE 4014762 (A1)**

Cpds. (II) for radiation therapy or diagnostics contg. Mossbauer absorbing nuclides (I), either in natural isotopic ratios or in enriched form, are new. (I) is an element from transition gps. VII or VIII, esp. Ru or Fe. (II) are esp. metallocene or half-sandwich-carbonyl complexes, which may be bound e.g. to mono- or polyclonal antibodies, esp. those against tumour antigens. USE/ADVANTAGE - (II) contain Fe enriched with <sup>57</sup>Fe (most suitable for therapy) or contain Ru enriched with <sup>99</sup>Ru (most suitable for diagnostics). The cpds. are stable so metal ion exchange does not take place and they are usually hydrophobic, so they are not readily removed from the body. Some (II) have high affinity for certain organs. Thus ferrocenyl-glycine has affinity for the kidney and 1-ferrocenyl-2-amino-propane and its N-alkyl derivs. have high affinity for the brain. Excitement of e.g. a <sup>57</sup>Fe atom in an organ with gamma-rays causes a localised Auger cascade and a very high localised radiation effect.

.....  
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 40 14 762 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 40 14 762.2  
㉑ Anmeldetag: 5. 5. 90  
㉒ Offenlegungstag: 7. 11. 91

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**A 61 K 49/02**  
C 07 F 17/00  
C 07 F 15/00  
C 07 D 471/04  
// C 01 G 55/00

DE 40 14 762 A 1

⑦ Anmelder:  
Wenzel, Martin, Prof. Dr., 1000 Berlin, DE

⑦ Erfinder:  
gleich Anmelder

⑤ Verbindungen zur Strahlentherapie oder Diagnostik durch Absorption von Mößbauer-Strahlung

⑤ Es werden Verbindungen zur Strahlentherapie oder Diagnostik vorgeschlagen, die in die Verbindungen Nuclide eingebaut enthalten, die Mößbauer-Absorber sind. Vorzugsweise werden dabei Nuclide von Metallen der 7. und 8. Nebengruppe des periodischen Systems vorgeschlagen. Besonders vorteilhaft sind die Derivate von Metallocenen oder Halbsandwich-Carbonylkomplexen vom Cymantren-Typ. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch an polyclonale oder monoclonale Antikörper gebunden sein.

DE 40 14 762 A 1

Nach einem Vorschlag von Mills et al. (1) können die eng lokalisierten Strahlungs-Effekte, die durch Absorption der Mößbauer-Strahlung von  $^{57}\text{Co}$  in  $^{57}\text{Fe}$  Atomen auftreten zur Radiotherapie von Krebszellen verwendet werden. Als Absorber wurde für diesen Zweck der Eisen-Bleomycin-Komplex benutzt, der mit  $^{57}\text{Fe}$  angereichert war. Dieser Komplex wurde hergestellt durch Auflösen von  $^{57}\text{Fe}$ -Metall in konzentrierter Salzsäure und Umsetzen des so entstandenen Eisen-Chlorids mit Bleomycin bei Normaltemperatur. Diese Strahlentherapie mittels Mößbauer-Effekt ist aber durch die vorgeschlagene Verwendung von  $^{57}\text{Fe}$ -Bleomycin allein limitiert, da die chemischen Eigenschaften der Bleomycin-Verbindung nicht weiter variiert werden können. Somit ist eine Anpassung der Strahlentherapie durch Absorption von Mößbauer-Strahlung an wechselnde Erfordernisse und eine weitere Optimierung nicht möglich.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, weitere Metall-Verbindungen zu beschreiben, die für die Strahlen-Therapie oder -Diagnostik durch Mößbauer-Absorption eingesetzt werden können. Jedoch ist es nur in Ausnahmefällen möglich, dafür einfache Metall-Komplexe zu verwenden: Erfindungsgemäße Ausnahmen sind einfache Ruthenium-Komplexe beispielsweise mit den Kationen  $[(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_5\text{Ru}']^{2+}$  oder  $[\text{Cl}(\text{NH}_3)_5\text{Ru}']^{2+}$ , sowie o-Phenantrolin-Komplexe des Ruthenium, wie cis  $[\text{Cl}_2(\text{phen})_2\text{Ru}']$ . Alle diese Verbindungen lagern sich sowohl an die DNS als an die RNS an (2). In den meisten anderen Fällen muß man aus mehreren Gründen komplizierte Komplex-Verbindungen einsetzen:

1. Die meisten Metall-Komplexe sind nicht stabil genug, so daß leicht in vivo ein Austausch des Metall-Ions zur Mößbauer-Absorption gegen ein anderes, körpereigenes Metall-Ion erfolgt.
2. Die meisten Komplexe sind relativ hydrophil. Sie werden daher schnell ausgeschieden und entsprechend ist eine Anreicherung in lipophilen Organ- oder Zellarealen nicht möglich.
3. Die meisten Komplexbildner können chemisch nicht abgewandelt werden, ohne daß die Fähigkeit zur Ausbildung stabiler Metall-Komplexe darunter leidet.

Um diese Nachteile zu vermeiden, wird vorgeschlagen, als weitere erfindungsgemäße Verbindungen Cyclopentadienyl-Metall-Komplexe z. B. vom Metallocen-Typ oder Cyclopentadienyl-Carbonyl-Metall-Komplexe vom Cymantren-Typ (Halbsandwich-Carbonyl-Komplexe) zu verwenden. Als besonders günstig haben sich in dieser Hinsicht Ferrocen- oder Ruthenocen-Derivate erwiesen, wobei deren Zentralatom mit dem  $^{57}\text{Fe}$ -Isotop bzw. dem  $^{99}\text{Ru}$ -Isotop über den natürlichen Gehalt hinaus angereichert sein kann. Die erfindungsgemäßen  $^{57}\text{Fe}$ -Verbindungen sind für die Strahlentherapie, die erfindungsgemäßen  $^{99}\text{Ru}$ -Verbindungen eher für die Strahlendiagnostik geeignet. Abweichungen hiervon sind aber möglich.

Nun ist aber eine Herstellung von Eisen-57-markiertem Ferrocen-Derivaten — analog zur Herstellung des  $^{57}\text{Fe}$ -Bleomycin — nicht möglich, da ein entsprechender Austausch der Zentralatome von Metallocenen bei Normaltemperatur nicht stattfindet. Durch Erhitzen der Komponenten entweder in Lösung oder der Schmelze gelingt es jedoch, in Metallocen-Derivate mit der ge-

wünschten Seitenkette die gewünschten Metall-Isotope wie beispielsweise  $^{57}\text{Fe}$  oder  $^{99}\text{Ru}$  einzubauen. Besonders effektiv ist diese Austauschreaktion des Zentralatoms, wenn unmittelbar am Cyclopentadienyl-Ring eine elektronenziehende Gruppe wie beispielsweise eine Carbonyl-Gruppe ( $-\text{CO}-$ ) vorhanden ist. Der Austausch wird ferner durch die Zugabe von wasserfreien Metallchloriden, wie z. B.  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{MnCl}_2$  und/oder Zugabe von konzentrierten Säuren, wie z. B.  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HCl}$  oder  $\text{HBr}$  begünstigt. Um Derivate von Cyclopentadienyl-Carbonyl-Komplexen herzustellen, kann man Metallocen-Derivat, Metall-Carbonyl und Metallsalz erhitzen, man erhält so durch Ligandenaustausch Cymantren-analoge Derivate, mit den Seitenketten wie im eingesetzten Metallocen-Derivat.

Man kann aber auch zuerst aus den entsprechenden Metallsalzen, wie z. B.  $^{57}\text{FeCl}_3$  oder  $^{99}\text{RuCl}_3$  und Cyclopentadien den Metallocen-Grundkörper nach bekannten Methoden herstellen, der anschließend zum gewünschten Derivat abgewandelt wird.

Das Metallocen-Molekül kann in vielfältiger Weise nach den Regeln der organischen Chemie variiert werden. Damit können gezielt solche Metallocen-Derivate hergestellt werden, die hohe Affinitäten zu bestimmten Organen, Tumoren oder bestimmten Strukturen innerhalb von Organen oder Zellen haben. Dabei zeigen Ruthenocen- und Ferrocen-Derivate meistens eine parallele Organaffinität, die von der Seitenkette gesteuert wird.

Als Beispiele seien hier genannt: Acetyl-ferrocen (Anreicherung in der Nebennierenrinde), Ferrocenoyl-glycin (Anreicherung in der Niere), 1-Ferrocenyl-2-amino-propan und seine N-Alkyl-Derivate (Anreicherung im Gehirn).

In einer besonderen Ausgestaltung der Erfindung werden erfindungsgemäß-markierte Metallocen-Derivate nach bekannten Methoden an polyklonale oder monoklonale Antikörper gebunden, die spezifisch gegen verschiedene Antigene insbesondere von Tumoren gerichtet sind.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung können an die Antikörper Chelatbildner gebunden werden, die stabile Chelate mit Mößbauer-Absorbern wie beispielsweise  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{99}\text{Ru}$ ,  $^{119}\text{Sn}$  oder Metalle aus der Gruppe der Lanthaniden wie beispielsweise  $^{151}\text{Eu}$  bilden. Als Chelatbildner kommen beispielsweise die Derivate folgender Verbindungen in Frage: Diethylentriamin-pentaessigsäure (DTPA), EDTA, DOTA usw.

Dazu werden die Antikörper zunächst mit aktivierten Derivaten der Chelatbildner umgesetzt, z. B. mit dem Säure-Anhydrid aus DTPA. Anschließend läßt man den am Protein gebundene Chelatbildner mit den entsprechenden Metall-Ionen reagieren. Dabei kann die Metall-Verbindung bestehend aus Antikörper, gebundenem Chelat und daran gebundenem Mößbauer-Absorber für die Klinik fertig ausgeliefert werden. Möglich ist aber auch eine Versendung der Antikörper-Chelat-Verbindung allein, die erst in der Klinik mit den entsprechenden Metall-Ionen umgesetzt wird.

Das letztere Verfahren hat den Vorteil, daß die Antikörper-Chelat-Verbindung für verschiedene Zwecke verwendet werden kann:

1. Nach Umsatz mit Metall-Ionen, die Mößbauer-Absorber darstellen als Mittel zur Strahlen-Therapie oder -Diagnostik.
2. Nach Umsatz mit geeigneten radioaktiven Metall-Ionen wie  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{52}\text{Fe}$  oder  $^{52}\text{Mn}$  zur nuklear-

medizinischen Diagnostik mit SPECT oder PET.  
3. Nach Umsatz mit Gadolinium-Ionen als NMR-Kontrastmittel.

Alle die oben benannten Verbindungen — einfache Ru-Komplexe, Metallocen-Derivate oder an Antikörper gebundene Chelate —, die Mößbauer-Absorber enthalten, können erfindungsgemäß zur Strahlen-Therapie oder -Diagnostik eingesetzt werden. Dabei kann in der Verbindung das Mößbauer-Absorber-Nuklid als einziges Isotop oder nur angereichert oder in der natürlichen Isotopen-Zusammensetzung vorhanden sein. Nach der Applikation erfindungsgemäßer Mößbauer-Absorber enthaltende Verbindungen werden sich diese selbst oder die oben erwähnten Antikörper mehr oder weniger selektiv in Organen bzw. an den Tumoren anreichern. Die biochemische Selektivität z. B. einer  $^{57}\text{Fe}$ -markierten Verbindung für bestimmte Organe oder Tumoren kombiniert mit der selektiven Strahlenbelastung ausschließlich in unmittelbarer Umgebung der Absorber-Atome führt — bei Bestrahlung mit einer Mößbauer-Quelle — zu einer hohen räumlichen Selektivität des Strahlungseffekts bei minimaler Strahlenbelastung des übrigen Körpers. Durch die Bestrahlung mit einer Mößbauer-Quelle werden die in der erfindungsgemäßen Verbindung als Absorber wirkenden Atome beispielsweise  $^{57}\text{Fe}$  durch die Absorption der monochromatischen Gamma-Strahlung der Quelle angeregt. Die z. B. von den  $^{57}\text{Fe}$ -Kernen — nach Bestrahlung mit  $^{57}\text{Co}$  — absorbierte Energie wird über eine interne Konversion, gefolgt von einer Auger-Kaskade freigesetzt. Die Auger-Kaskade ionisiert alle das  $^{57}\text{Fe}$  direkt umgebenden Atome und führt zu sehr hohen lokalen Strahleneffekten. Die Strahlenbelastung der außerhalb der Anreicherungs-Bezirke liegenden Körperareale ist um Zehnerpotenzen geringer, selbst wenn sie geometrisch von der Strahlung der Mößbauer-Quelle erfaßt werden.

Bei der Strahlendiagnostik werden erfindungsgemäße Verbindungen mit solchen Mößbauer-Absorbern verwendet, deren Anregungsenergie höher als beim  $^{57}\text{Fe}$  ist und die dementsprechend eine höhere energetische  $\gamma$ -Strahlung als Sekundärstrahlung aussenden, beispielsweise 90 keV bei  $^{99}\text{Ru}$  als Absorber falls man  $^{99}\text{Rh}$  als Quelle benutzt. Diese  $\gamma$ -Strahlung kann dann in bekannter Weise zur szintigraphischen Lokalisation pathologischer Strukturen verwendet werden. Diese müssen bei  $^{99}\text{Ru}$  relativ Oberflächen-nah sein. Dabei ist es ein Vorteil, daß die zur Diagnostik verwendeten  $\gamma$ -Strahlen durch die äußere Bestrahlung mit einer Mößbauer-Quelle nur in dem Körperareal erzeugt werden, das szintigraphisch dargestellt werden soll. Außerdem kann eine längere Zeit abgewartet werden, bis die nicht gebundenen Anteile den Körper verlassen haben, bevor die externe Strahlenquelle an die gewünschte Körperstelle gebracht wird und damit die Strahlentherapie oder Diagnostik beginnt.

#### Beispiel zum Einbau von Fe-Isotopen in Ferrocen-Derivate

Um den Isotopen-Austausch bei den Ferrocen-Verbindungen besser messen zu können, wurde mit dem radioaktiven Eisenisotop  $^{59}\text{Fe}$  anstelle von  $^{57}\text{Fe}$  gearbeitet.

Eine Lösung von  $0,2 \mu\text{Ci } ^{59}\text{FeCl}_3$  in 0,1 ml Ethanol wird in einer kleinen Glasampulle zur Trockne eingedampft, dazu wiegt man 5 mg Acetylferrocen und als Katalysator 1 mg wasserfreies  $\text{MnCl}_2$ .

a) Die abgeschmolzene Ampulle wird 1 h bei  $165^\circ\text{C}$  erhitzt, danach durch Dünnschicht-Chromatographie das radioaktive Acetylferrocen abgetrennt. Einbau des Eisen-Isotops zu 60—80%.

b) Löst man den obigen Ampullen-Inhalt in 0,15 ml Methanol mit 1% HCl und erhitzt 1 h auf  $140^\circ\text{C}$ , so erhält man 14% des Eisen-Isotops im abgetrennten Acetylferrocen.

Chromatographie auf Kieselgel-Platten (0,25 mm) in Petrolether/Aceton/Chloroform 16:4:2.  $R_F$ -Acetylferrocen: 0,63.

#### Literatur

1. A novel cancer therapy using a Mößbauer-isotope compound. R. L. Mills, C. W. Walter, L. Venkataraman, K. Pang and J. F. Ferrel. *Nature* 336, 787 (1988).
2. Progress in Clinical Biochemistry and Medicine "Ruthenium and other Non-Platinum-Metal-Complexes" in Cancer Chemotherapy, Springer-Verlag Berlin (1989).

#### Patentansprüche

1. Verbindungen zur Strahlen-Therapie oder Diagnostik, dadurch gekennzeichnet, daß sie Nuklide enthalten, die Mößbauer-Absorber sind, wobei das jeweilige Nuklid das entsprechende Mößbauer-Isotop in seinem natürlichen Gehalt oder angereichert enthalten kann.
2. Verbindungen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie Nuklide von Metallen der 7. und 8. Nebengruppe des Periodischen Systems enthalten, die Mößbauer-Absorber darstellen.
3. Verbindungen gemäß Anspruch 1—2, dadurch gekennzeichnet, daß sie Komplexe des Rutheniums enthalten.
4. Verbindungen gemäß Anspruch 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß sie Amin und/oder Phenantrolin-Komplexe des Rutheniums darstellen.
5. Verbindungen gemäß Anspruch 1—2, dadurch gekennzeichnet, daß sie Derivate von Metallocenen oder von Halbsandwich-Carbonyl-Komplexen vom Cymantren-Typ darstellen.
6. Verbindungen gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie Metallocen-Derivate oder Halbsandwich-Carbonyl-Komplexe mit  $^{57}\text{Fe}$  oder  $^{99}\text{Ru}$  als Zentralatom darstellen.
7. Verbindungen gemäß Anspruch 1, 2 und 5—6, dadurch gekennzeichnet, daß sie Metallocen-Derivate oder Halbsandwich-Carbonyl-Derivate mit  $^{57}\text{Fe}$  oder  $^{99}\text{Ru}$  enthalten, die an polyklonale oder monoklonale Antikörper vorzugsweise gegen Tumor-Antigene gebunden sind.
8. Verbindungen gemäß Anspruch 1—2, dadurch gekennzeichnet, daß sie Chelatbildner enthalten, die an polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen Tumorantigene gebunden sind, und die Metall-Ionen, die Mößbauer-Absorber darstellen, komplexieren.
9. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen gemäß Anspruch 1—2 und 5—6, dadurch gekennzeichnet, daß die Metallocen-Derivate, oder Cyclopentadienyl-Carbonyl-Derivate in der Schmelze oder in geeigneten Lösungsmitteln wie niedrige Alkohole, Eisessig, Nitromethan, Nitroethan, Dioxan, Dimethylformamid, Dekalin auf  $100\text{—}230^\circ\text{C}$ , vor-

zugsweise auf 120—180°C mit Salzen von Metallen der 7. und 8. Nebengruppe und/oder ihren Carbo-nylen erhitzt werden, die Mößbauer-Absorber darstellen.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65